

exbio

DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kit 25 testes | Cat. N.º ED7750



Instruções de Utilização (PT)

Versão: ED7750_IFU_v2_PT

Data de emissão: 25-10-2024

Símbolos utilizados na etiquetagem do dispositivo

	Dispositivo médico de diagnóstico in vitro		Limites de temperatura
	Marca CE de conformidade Número de identificação do órgão notificado		Manter afastado da luz solar
	Fabricante		Manter em local seco
	Identificador Único de Dispositivo		Cuidado
	Consultar instruções de utilização		Não reutilizar
	Contém o suficiente para <n> testes		Contém <n> tubos para testes de uso único
	Número de catálogo		Solução concentrada (10x)
	Código de lote		Conteúdos
	Data de validade		Marca UKCA

1. Finalidade prevista

O Kit DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay destina-se à detecção de alta sensibilidade e enumeração de células com deficiência de glicofosfatidilinositol (GPI) no sangue total humano por citometria de fluxo.

O que é detetado e/ou medido

O dispositivo DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kit deteta e enumera células com deficiência de glicofosfatidilinositol (GPI) (clones PNH) como percentagem de:

- células CD59 dim ou CD59- de todos os eritrócitos (CD235a+)
- células CD59 dim ou CD59- de todos os iRBCs (CD235a+CD71+)
- células CD14-, CD157- e âncora GPI- de todos os monócitos (CD45+CD64+)
- células CD24-, CD157- e âncora GPI- de todos os granulócitos neutrófilos (CD45+CD15+)

Função do dispositivo

O dispositivo destina-se ao diagnóstico e monitorização de pacientes que sofram ou que se suspeite sofrerem de Hemoglobinúria Paroxística Noturna (HPN) e distúrbios relacionados ⁽¹⁾.

Contexto do estado fisiológico ou patológico

A Hemoglobinúria Paroxística Noturna (HPN) é uma doença rara das células-tronco hematopoéticas que surge como consequência da expansão clonal não maligna das células com mutação somática do gene da Biossíntese da Âncora de Fosfatidilinositol Glicano (PIGA) de Classe A. As mutações do gene PIGA resultam na incapacidade de expressar proteínas da superfície celular ancoradas no glicofosfatidilinositol (GPI).

O dispositivo destina-se a detetar granulócitos neutrófilos e monócitos com deficiência de GPI ⁽¹⁾, juntamente com eritrócitos com deficiência completa (Tipo III) e parcial (Tipo II) de GPI ^(2,3,4,5,6) para avaliação da dimensão do clone de HPN.

Adicionalmente, o dispositivo deteta iRBCs com deficiência de GPI (eritrócitos imaturos) em pacientes que recebam transfusões sanguíneas quando os eritrócitos de HPN são difíceis de delinear ⁽⁷⁾.

Tipo de ensaio

Não automatizado

Quantitativo

Tipo de espécime requerido

Amostra de sangue total periférico humano anticoagulado (EDTA, heparina, citrato) ⁽¹⁾

População de teste

Pacientes com:

- Marcadores laboratoriais de hemólise, quando outras causas mais comuns de hemólise tiverem sido excluídas,
- Tromboses inexplicadas em faixa etária jovem,
- Tromboses diagnosticadas num local incomum,
- Anemia aplástica (AA) herdada ou adquirida,
- Síndrome mielodisplásica (SMD),
- Citopenia inexplicada na qual a AA ou a SMD sejam considerações de diagnóstico diferencial ⁽¹⁾

2. Utilizador pretendido

O dispositivo destina-se apenas a uso profissional em laboratório. Não para testes próximos dos pacientes ou autoteste.

Requisitos de qualificação

O utilizador previsto deve possuir conhecimentos especializados de ponta em análise de citometria de fluxo de células humanas, técnicas laboratoriais padrão, incluindo técnicas de pipetagem, manipulação segura e adequada de espécimes derivados do corpo humano.

O utilizador previsto deve cumprir a norma EN ISO 15189 ou outras disposições nacionais, quando aplicável.

3. Princípio de análise

O princípio do teste baseia-se na deteção da âncora do GPI e das proteínas ancoradas em GPI na superfície das células sanguíneas humanas. Os anticorpos monoclonais e a proaerolisina recombinante usados no teste são rotulados com diferentes fluorocromos que são excitados por um feixe de laser de um citómetro durante a aquisição de uma amostra de sangue corado. A fluorescência subsequente (emissão de luz) de cada fluorocromo presente numa célula de sangue adquirida é recolhida e analisada pelo instrumento. A intensidade da fluorescência é diretamente proporcional à densidade da expressão do antigénio numa célula, permitindo a separação de diferentes subconjuntos de células.

4. Reagente(s) fornecido(s)

Conteúdos

O dispositivo DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kit, suficiente para análise de 25 pacientes, é fornecido com os seguintes reagentes:

PNH High-Sensitivity Assay (25 bolsas). Cada bolsa consiste em 1 tubo de uso único com tampa com código de cor (faixa ciano) **PNH WBC 7-color** (ED7750-1) e 1 tubo de uso único com tampa com código de cor (faixa vermelha)

PNH RBC 3-color (ED7750-2), que contêm combinações previamente misturadas de reagentes rotulados com fluorocromo e secadas com os ingredientes estabilizadores como camada no fundo dos tubos de ensaio (12 x 75 mm); consulte as Tabelas 1 e 2.

Lysing Solution ED7750-3 (1 frasco) contendo 15 ml de solução tamponada concentrada (10X) à base de formaldeído.

PNH Compensation Set ED7750-4 (1 bolsa) contendo 10 tubos de uso único com tampa, cada uma com um único reagente rotulado com fluorocromo que foi secado com os ingredientes estabilizadores como camada no fundo do tubo (12x75 mm).

CUIDADO: O Conjunto de Compensação PNH destina-se apenas à preparação da compensação. Os reagentes únicos rotulados com fluorocromo (ver Tabela 1 e Tabela 2) permitem um procedimento de compensação fácil e preciso.

Composição

Tabela 1 Descrição dos ingredientes ativos PNH WBC 7-color

Antigénio	Fluorocromo	Clone	Isótopo
Âncora GPI (proaerolisina)	Alexa Fluor®488	N/A	N/A
CD157	PE	SY11B5	IgG1
CD45	PerCP-Cy™5,5	2D1	IgG1
CD64	PE-Cy™7	10.1	IgG1
CD24	APC	SN3	IgG1
CD14	APC-Cy™7	MEM-15	IgG1
CD15	Pacific Blue™	MEM-158	IgM

Tabela 2 Descrição dos ingredientes ativos PNH RBC 3-color

Antigénio	Fluorocromo	Clone	Isótopo
CD235a	FITC	JC159	IgG1
CD59	PE	MEM-43	IgG2a
CD71	APC	MEM-75	IgG1

5. Materiais necessários, mas não incluídos

Água desionizada (Reagent-grade)

Solução salina de fosfato tamponada (1X PBS), pH 7.2 - 7.4

Partículas de compensação da citometria de fluxo (Spherotech SPHERO™ COMPtrol Kit, Cat. No. CMLgP-50-3K ou partículas de compensação equivalentes)

6. Equipamento necessário

Pipeta automática com pontas descartáveis (100 µl – 5 ml) para pipetagem de espécimes e reagentes

Dispensador de líquidos ou pipeta com pontas descartáveis (2 ml) para dispensação de solução de lisagem de eritrócitos

Misturador Vortex

Tubos centrífugos cónicos em polipropileno (15 ml ou 50 ml) para preparação de amostras

Centrifugadora com adaptadores de rotor apropriados para tubos de fundo redondo com 12 x 75 mm

Citómetro de fluxo com três fontes de excitação a laser (488 nm, ~635 nm e 405 nm), detetores para espalhadores, filtros óticos e detetores de emissões apropriados para recolher os sinais de fluorocromos indicados na Tabela 3.

Tabela 3 Característica espectral dos fluorocromos utilizados no dispositivo

Fluorocromo	Excitação [nm]	Emissões [nm]
Alexa Fluor® 488	488	520
FITC	488	525
PE	488	576
PerCP-Cy™5.5	488	695
PE-Cy™7	488	780
APC	630 – 640	660
APC-Cy™7	630 - 640	780
Pacific Blue™	405	455

AVISO: O dispositivo foi testado em citómetros de fluxo BD FACSCanto™ II (BD Biociências), BD FACSLytic™ (BD Biociências), Navios EX (Beckman Coulter) e DxFLEX (Beckman Coulter).

7. Armazenamento e manuseamento

Armazenar a 2 -30 °C.

Evitar a exposição prolongada à luz.

Mantenha seco.

CUIDADO: Produto sensível à humidade. Não abrir a bolsa de alumínio até à primeira utilização.

Consulte o Procedimento da Secção 10 (Preparação do(s) reagente(s) fornecido(s)) para informações sobre as condições de armazenamento e a estabilidade das soluções ativas (quando aplicável).

8. Avisos, precauções e limitações de utilização

Classificação de Perigos GHS

ADVERTÊNCIA: A solução de lisagem (ED7750-3) contém formaldeído (CAS No. 50-00-0) e metanol (CAS No. 67-56-1) em concentrações classificadas como perigosas.

Elementos de etiqueta	Palavra de sinal
	Perigo
	
Frases H	H315: Provoca irritação cutânea. H317: Pode provocar uma reacção alérgica cutânea. H319: Provoca irritação ocular grave. H335: Pode provocar irritação das vias respiratórias. H341: Suspeito de provocar anomalias genéticas. H350: Pode provocar cancro. H371: Pode afectar os órgãos. H373: Pode afectar os órgãos após exposição prolongada ou repetida. H302+H312+H332: Nocivo por ingestão, em contacto com a pele por inalação.
Frases P	P201: Pedir instruções específicas antes da utilização. P260: Não respirar os vapores. P264: Lavar bem as mãos e as partes expostas do corpo após manuseamento. P280: Usar luvas de protecção/vestuário de protecção/protecção ocular/protecção facial. P301+P312: EM CASO DE INGESTÃO: caso sinta indisposição, contacte um CENTRO DE INFORMAÇÃO ANTIVENENOS ou um médico. P302+P352: SE ENTRAR EM CONTACTO COM A PELE: lavar com sabonete e água abundantes. P305+P351+P338: SE ENTRAR EM CONTACTO COM OS

OLHOS: enxaguar cuidadosamente com água durante vários minutos. Se usar lentes de contacto, retire-as, se tal lhe for possível. Continuar a enxaguar.
P308+P313: EM CASO DE exposição ou suspeita de exposição: consulte um médico.
P314: Em caso de indisposição, consulte um médico.
P333+P313: Em caso de irritação ou erupção cutânea: consulte um médico.
P362+P364: Retirar a roupa contaminada e lavá-la antes de a voltar a usar.

Consulte a Ficha de Dados de Segurança (FDS) disponível na página do produto em www.exbio.cz para obter informações completas sobre os riscos colocados pelas substâncias e misturas químicas contidas no Produto e como devem ser manuseadas e eliminadas.

Perigo biológico

Amostras biológicas humanas e amostras de sangue e quaisquer materiais que entrem em contacto com elas são sempre considerados como materiais infecciosos.

Utilizar equipamento de proteção pessoal e de segurança para evitar o contacto com a pele, olhos e membranas mucosas.

Seguir todas as leis, regulamentos e procedimentos aplicáveis para o manuseamento e eliminação de materiais infecciosos.

Evidência de deterioração

O aspeto normal do reagente fornecido é uma camada seca transparente no fundo do tubo. Não utilizar o reagente se observar qualquer alteração na aparência, por exemplo, presença de humidade no interior do tubo.

Limitação de utilização

Não utilizar após a data de validade indicada nos rótulos dos produtos.

Não reutilizar os tubos de ensaio.

9. Espécime

Utilize sangue venoso periférico colhido num recipiente de amostra classificado como dispositivo médico, com anticoagulante EDTA, heparina ou ACD (Acid Citrat Dextrose)⁽²⁾.

Utilize apenas o espécime não tratado. Não utilize espécimes pré-lisados, lavados ou diluídos.

Processe a amostra de sangue o mais tardar 48 horas após a colheita. Conserve o espécime à temperatura do laboratório (20 - 25°C). Não refrigere o espécime.

Interferência Endógena

Com base na investigação da literatura científica, as fontes de interferência endógenas são identificadas na Tabela 4.

Tabela 4 Interferência Endógena do dispositivo

Interferência Endógena	Impacto	Referência
Albumina	A albumina pode interferir em concentrações elevadas devido à sua capacidade de se ligar e de libertar grandes quantidades de ligandos.	9, 10, 26
Bilirrubina (ícteria) (não conjugado)	A bilirrubina aumenta o fundo de fluorescência das células devido à sua elevada autofluorescência.	13, 15, 19
Resíduos celulares (após lise)	Os detritos celulares podem provocar contagens incorretas de células e esgotar o anticorpo no dispositivo.	12, 16
Eritrócitos	Uma lise insuficiente e a presença de glóbulos vermelhos na amostra podem conduzir a uma contagem incorreta de células.	17
Hemoglobina	As amostras hemolisadas podem produzir resultados pouco fiáveis.	14
Anticorpos humanos anti-murinos	Pode afetar a funcionalidade do dispositivo (capacidade de se ligar a antigénios de superfície celular).	11, 21, 22, 23, 24, 25
Imunoglobulinas	Pode afetar a contagem de subgrupos de linfócitos.	12
Fatores reumatóides	A presença de RF (fator reumatoide) interfere com os MIA (imunoensaios multiplex).	18
Triglicéridos	Níveis elevados de lípidos em circulação podem afetar a análise por citometria de fluxo de determinadas populações de células sanguíneas.	20

Interferência Exógena

De acordo com artigos publicados por Sutherland et. al. ⁽⁷⁾, os glóbulos vermelhos provenientes de transfusões de sangue são uma interferência importante na análise da HPN em pacientes com um clone grande de HPN que sofram de hemólise extravascular. Os eritrócitos saudáveis recebidos por transfusão afetam significativamente a monitorização do clone da HPN na linhagem de glóbulos

vermelhos (RBC). A adição de CD71 melhora significativamente a capacidade de analisar os tamanhos dos clones de HPN na linhagem de hemácias, independentemente do estado hemolítico e/ou transfusional do paciente. O dispositivo DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kit resolve este problema de acordo com as diretrizes anteriormente mencionadas, oferecendo o antigénio CD71 para a identificação de glóbulos vermelhos imaturos (iRBC), em que os iRBC também expressam o antigénio CD59 ancorado em GPI. Nos sacos de transfusão, os glóbulos vermelhos imaturos são normalmente representados numa quantidade muito baixa ⁽²⁷⁾. Por outro lado, os pacientes que sofrem hemólise extravascular causada pela HPN têm um aumento na contagem de glóbulos vermelhos imaturos devido à rápida perda de eritrócitos ⁽²⁸⁾. Assim, com a adição do anticorpo monoclonal CD71 para a identificação de glóbulos vermelhos imaturos, o médico pode monitorizar com maior precisão a progressão da HPN, que se manifesta pela perda do antigénio CD59 nos glóbulos vermelhos imaturos, ultrapassando a interferência de glóbulos vermelhos exógenos provenientes dos sacos de transfusão. O DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kit contém o anticorpo CD71 anti-humano e permite a utilização das diretrizes mais recentes para a deteção e quantificação de clones de HPN.

10.Procedimento

Preparação do(s) reagente(s) fornecido(s)

PNH High-Sensitivity Assay

Não é necessária preparação de reagentes, são fornecidos em tubos de ensaio apenas para uso único.

Lysing Solution

Colocar o reagente à temperatura ambiente antes de o utilizar.

O reagente é concentrado 10X e deve ser diluído com água desionizada antes da utilização (1 volume da solução concentrada e 9 volumes de água desionizada). Após a primeira abertura, o reagente mantém as suas características de desempenho até ao termo do prazo de validade, quando conservado nas condições previstas, no seu recipiente primário de origem.

A solução de lise diluída (1X) é estável durante 1 mês quando armazenada num dispensador de líquidos ou recipiente fechado à temperatura ambiente.

Preparação de materiais necessários, mas não incluídos

Partículas de compensação

Prepare a solução ativa de partículas de compensação da citometria de fluxo de acordo com as instruções do fabricante.

Preparação da compensação

Adquira tubos de Set de Compensação usando a mesma configuração do citómetro

de fluxo, antes da análise dos tubos de PNH RBC 3-color e de PNH WBC 7-color.

CUIDADO: Os procedimentos de preparação da compensação de PNH RBC 3-color e de PNH WBC 7-color diferem no tipo de preparação de espécimes e de coloração da amostra.

Tubos de compensação PNH RBC 3-color (faixa vermelha)

1. Adicione o Kit SPHERO™ COMPtrol ou partículas de compensação equivalentes no fundo de cada tubo de compensação de cor única.
2. Coloque no agitador Vortex e incube os tubos de ensaio durante 20 minutos à temperatura ambiente no escuro.
3. Adicione 4 ml de 1X PBS a cada tubo de compensação. Centrifugue 5 minutos a 300 ×g.
4. Descarte o sobrenadante sem perturbar as partículas de compensação e adicione 0,1 ml de 1X PBS a cada tubo de compensação.
5. Defina as tensões nos detetores de fluorescência de interesse antes da análise de amostras coradas. A tensão num detetor de PMT deve ser definida suficientemente alta, para que o mínimo de eventos com manchas negativas interfira com o 0.º canal no eixo de fluorescência. Além disso, a tensão do detetor de PMT não deve exceder os valores em que os eventos positivos são pressionados para o eixo direito.
6. Adquira os tubos de compensação corados imediatamente usando o citómetro de fluxo.
7. Calcule a matriz de compensação PNH RBC 3-color no software do citómetro, desenvolvido pelo fabricante, ou no software dedicado à análise de dados de citometria offline. Use esta matriz de compensação para todos os tubos de ensaio deste lote de PNH RBC 3-color.

CUIDADO: Uma vez ajustadas para o lote específico de PNH RBC 3-color, não altere as definições dos detetores de fluorescência para reter as mesmas definições de aquisição da matriz de compensação e os mesmos resultados de compensação.

Tubos de compensação PNH WBC 7-color (faixa ciano)

1. Adicione 50 µl de água deionizada no fundo de cada tubo de compensação de cor única e coloque no agitador Vortex numa velocidade vigorosa durante 7-10 segundos.
2. Adicione 100 µl de sangue total periférico a cada tubo de compensação de cor única e coloque no agitador Vortex numa velocidade vigorosa.

3. Incube os tubos de ensaio durante 20 minutos à temperatura ambiente no escuro.
4. Adicione 2 ml de solução de lisagem diluída (1X) a cada tubo de compensação.
5. Incube os tubos de ensaio durante 10 minutos à temperatura ambiente no escuro.
6. Centrifugue durante 5 minutos a 300 ×g, descarte o sobrenadante e volte a suspender o agregado de células em 2 ml de 1X PBS.
7. Centrifugue durante 5 minutos a 300 ×g, descarte o sobrenadante e volte a suspender o agregado de células em 0,2 ml de 1X PBS.
8. Defina as tensões nos detetores de fluorescência de interesse antes da análise de amostras coradas. A tensão num detetor de PMT deve ser definida suficientemente alta, para que o mínimo de eventos com manchas negativas interfira com o 0.º canal no eixo de fluorescência. Além disso, a tensão do detetor de PMT não deve exceder os valores em que os eventos positivos são pressionados para o eixo direito.
9. Adquira os tubos de compensação corados imediatamente usando o citómetro de fluxo.
10. Calcule a matriz de compensação PNH WBC 7-color no software do citómetro, desenvolvido pelo fabricante, ou no software dedicado à análise de dados de citometria offline. Use esta matriz de compensação para todos os tubos de ensaio deste lote de PNH WBC 7-color.

CUIDADO: Uma vez ajustadas para o lote específico de PNH WBC 7-color, não altere as definições dos detetores de fluorescência para reter as mesmas definições de aquisição da matriz de compensação e os mesmos resultados de compensação.

Preparação de amostras

A detecção e diferenciação de clones PNH em eritrócitos usando o tubo PNH RBC 3-color requer preparação de amostras antes do procedimento de coloração.

AVISO: Antes de processar a amostra, garanta que o citómetro foi devidamente preparado.

1. Rotule um tubo cónico de polipropileno com a identificação da amostra de sangue examinada.
2. Extraia com uma pipeta 10 µl de amostra de sangue bem misturada para o fundo do tubo cónico rotulado.
3. Dilua a amostra de sangue: 1:100 com 1 ml de 1X PBS e misture à mão,

oscilando-a durante 5 segundos.

CUIDADO: A forma clássica de PNH é dominada pela hemólise intravascular. Antes de diluir a amostra de sangue, consulte os valores de RBC do analisador hematológico para atingir os valores de RBC da amostra de sangue diluído no intervalo de $3 - 5 \times 10^7$ / ml de sangue diluído e ajuste o fator de diluição conforme necessário para adquirir valores suficientes de RBC no citômetro de fluxo.

4. Realize o procedimento de coloração da amostra imediatamente após a diluição da mesma.

A detecção de células com deficiência de GPI em granulócitos neutrófilos usando o tubo PNH WBC 7-color não requer preparação de amostras antes do procedimento de coloração.

Coloração de amostra - tubo PNH RBC 3-color (faixa vermelha)

1. Rotule um tubo PNH RBC 3-color com a identificação da amostra de sangue examinada.
2. Extraia com uma pipeta 50 µl de amostra de sangue diluída e bem misturada para o fundo do tubo PNH RBC 3-color.

CUIDADO: Evite a pipetagem de sangue na lateral do tubo de ensaio. Se o esfregaço ou gota de sangue permanecer na lateral do tubo, poderá não ser tingido com o reagente e os resultados do teste podem não ser válidos.

3. Coloque no agitador Vortex numa velocidade vigorosa durante 7-10 segundos.

CUIDADO: O encurtamento do tempo no Vortex poderá afetar os resultados do teste.

4. Incube o tubo PNH RBC 3-color durante 20 minutos à temperatura ambiente no escuro.
5. Adicione 4 ml de 1X PBS ao tubo PNH RBC 3-color.
6. Centrifugue o tubo PNH RBC 3-color durante 5 minutos a 300 ×g.
7. Descarte o sobrenadante sem perturbar o agregado de células e adicione 0,5 ml de 1X PBS ao tubo PNH RBC 3-color.
8. Colocar no Vortex brevemente para voltar a suspender o agregado de células.

Adquira a amostra corada usando o citômetro de fluxo. Se a amostra corada não for adquirida imediatamente, tapar o tubo de ensaio, armazenar a 2-8 °C no escuro e analisar no prazo de 2 horas.

CUIDADO: Desfaça os agregados de células na amostra corada fazendo deslizar o tubo de ensaio contra o suporte de tubos imediatamente antes da aquisição no citômetro de fluxo. Um montante excessivo de agregados de RBC poderá afetar os resultados do teste.

Coloração de amostra - tubo PNH WBC 7-color (faixa ciano)

1. Rotule um tubo PNH WBC 7-color com a identificação da amostra de sangue examinada.
2. Adicione 50 µl de água deionizada ao tubo de ensaio PNH WBC 7-color. Coloque no agitador Vortex numa velocidade vigorosa durante 7-10 segundos.

CUIDADO: O encurtamento do tempo no Vortex poderá afetar os resultados do teste.

3. Extraia com pipeta 100 µl de amostra de sangue bem misturada para o fundo do tubo de ensaio PNH WBC 7-color e agite suavemente no Vortex.

CUIDADO: Evite colocar com a pipeta o sangue na lateral do tubo de ensaio. Se o esfregaço ou gota de sangue permanecer na lateral do tubo, poderá não ser tingido com o reagente e os resultados do teste podem não ser válidos.

4. Incubar durante 20 minutos à temperatura ambiente no escuro.
5. Adicione 2 ml de 1X solução ativa de lisagem de eritrócitos ao tubo PNH WBC 7-color.
6. Incube os tubos de ensaio durante 10 minutos à temperatura ambiente no escuro.
7. Centrifugue o tubo PNH WBC 7-color durante 5 minutos a 300 ×g.
8. Descarte o sobrenadante sem perturbar o agregado de células e adicione 2 ml de 1X PBS ao tubo de ensaio.
9. Centrifugue o tubo PNH WBC 7-color durante 5 minutos a 300 ×g.
10. Descarte o sobrenadante sem perturbar o agregado de células e adicione 0,2 ml de 1X PBS ao tubo de ensaio.
11. Colocar no Vortex brevemente para voltar a suspender o agregado de células.

Adquira a amostra corada usando o citômetro de fluxo. Se a amostra corada não for adquirida imediatamente, tapar o tubo de ensaio, armazenar a 2-8 °C no escuro e analisar no prazo de 24 horas.

Análise de citometria de fluxo

O medidor de caudal selecionado para utilização com o dispositivo DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kit deve ser calibrado numa base de rotina utilizando micro esferas fluorescentes para assegurar uma sensibilidade estável dos detetores de acordo com as instruções do fabricante do medidor de caudal.

Se não for mantido corretamente, o ocitómetro defluxopode produzir resultados falsos.

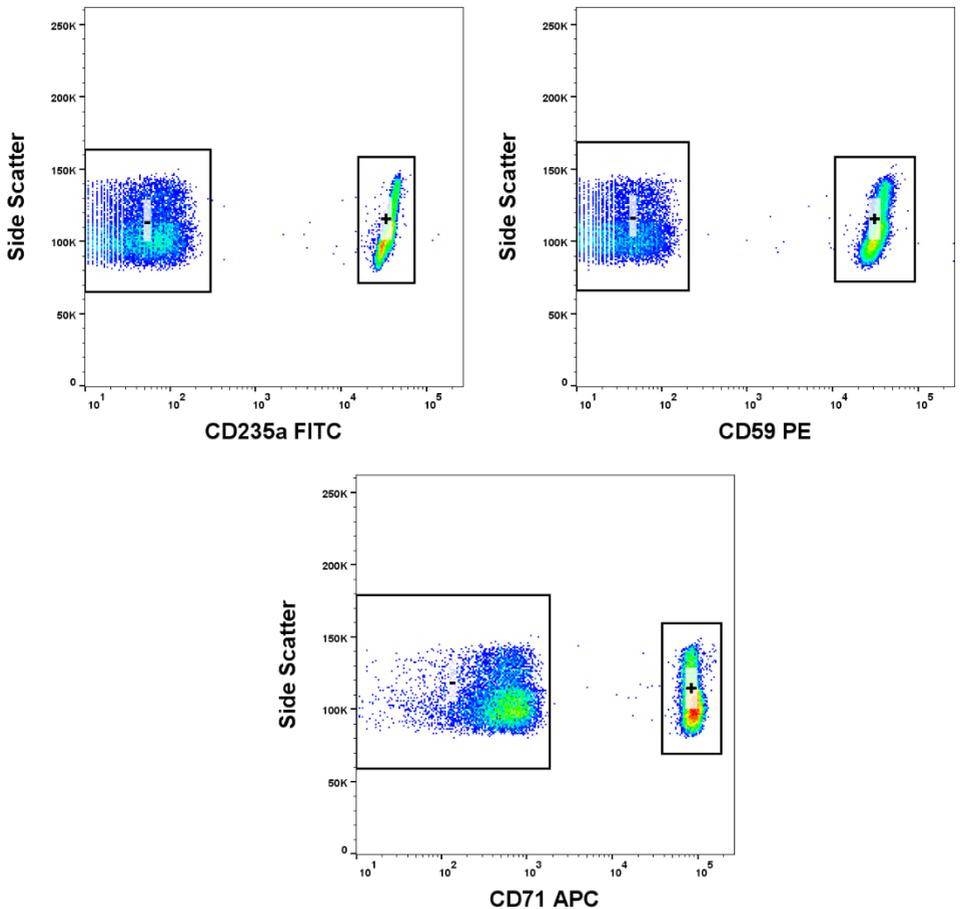
Consultar as especificações do fabricante para os lasers e detetores fluorescentes de acordo com as características de excitação e emissão dos fluorocromos na Secção 6 Equipamento necessário.

Para a análise de dados medidos, é possível utilizar software de citómetro desenvolvido pelo fabricante, ou software dedicado à análise de dados de citometria offline (por exemplo FlowJo™, VenturiOne®, Infinicyt™).

Análise de tubos de compensação PNH RBC 3-color (faixa vermelha)

Visualize os dados não compensados de cada tubo de compensação numa dispersão lateral (SSC) versus um diagrama de pontos de “fluorocromo a ser compensado”. Defina os limites para as partículas de compensação positivas (+) e negativas (-) da citometria, conforme representado na Figura 1.

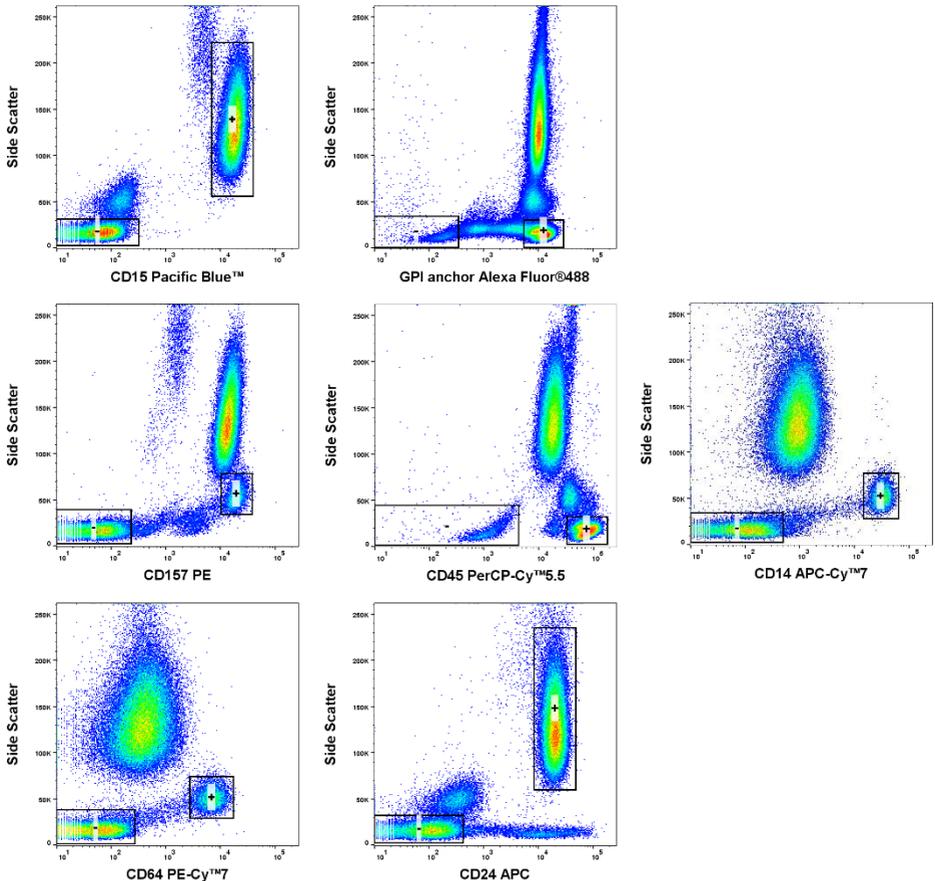
Figura 1 Identificação de partículas de compensação positivas (+) e negativas (-) da citometria nos tubos de compensação (dados adquiridos no BD FACSCanto™ II).



Análise de tubos de compensação PNH WBC 7-color (faixa ciano)

Visualize os dados não compensados de cada tubo de compensação numa dispersão lateral (SSC) versus um diagrama de pontos de “fluorocromo a ser compensado”. Defina os limites para as populações mais positivas (+) e mais negativas (-) conforme representado na Figura 2.

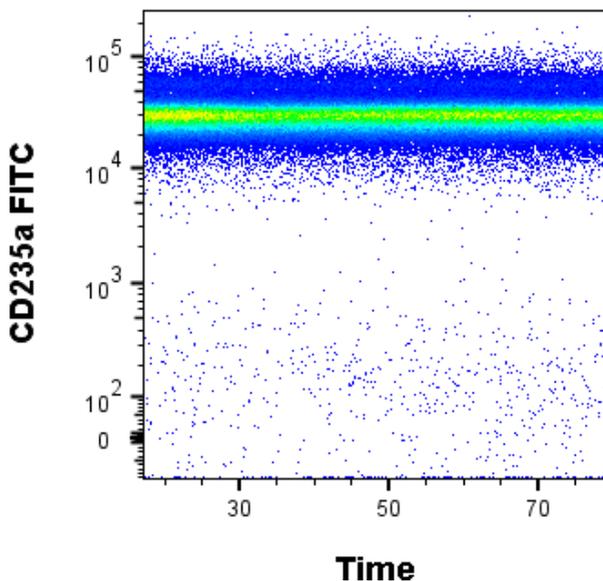
Figura 2 Identificação dos eventos mais positivos (+) e mais negativos (-) nos tubos de compensação (dados adquiridos no BD FACSCanto™ II).



Tubo PNH RBC 3-color (faixa vermelha)

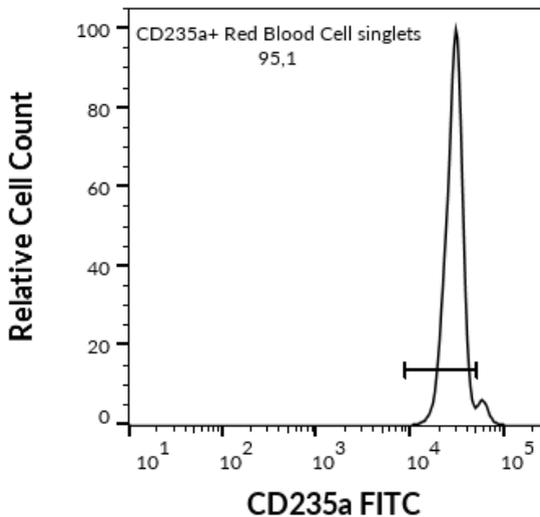
Devido ao reduzido valor de $iRBCs$ na amostra de sangue diluído, adquira 500 000 - 1 500 000 eventos de eritrócitos para análise. A aquisição de $\geq 500\ 000$ eventos resulta em tempos de aquisição mais longos. Isto poderá afetar o equilíbrio complexo da vinculação anticorpos-antígenos e a diminuição da fluorescência CD235a FITC. Monitorize sempre a estabilidade da intensidade da fluorescência ao longo do tempo de aquisição (Figura 3).

Figura 3 Todos os eventos adquiridos num diagrama de pontos CD235a FITC vs. Tempo (dados adquiridos no BD FACSCanto™ II).



Visualize os dados compensados como histograma, em que o eixo X representa a intensidade de fluorescência no canal FITC. Definir o limite “CD235a+ RBC singlets” (Figura 4).

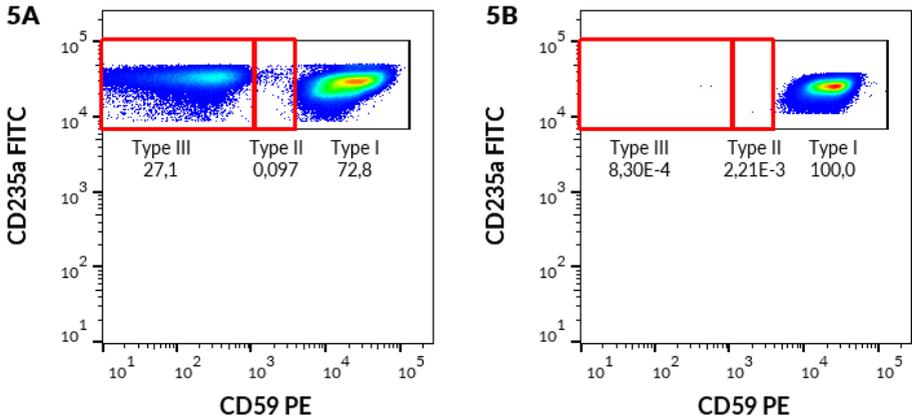
Figura 4 Delineamento de singletos CD235a+ RBC (dados adquiridos no BD FACSCanto™ II).



Eritrócitos

Visualize os singletos CD235a+ RBC num diagrama de pontos CD59 PE versus CD235a FITC. Separar eventos em três populações usando três limites apropriados (Figura 5) e calcular a porcentagem de eventos nas regiões do Tipo I, Tipo II e Tipo III.

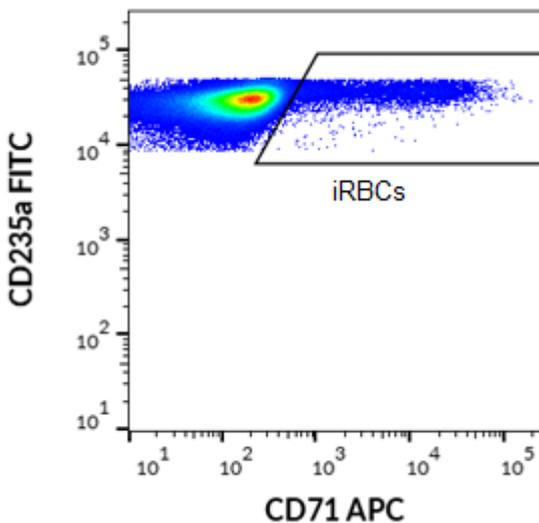
Figura 5 Singletos CD235a+ RBC num diagrama de pontos CD59 PE vs. CD235a FITC (dados adquiridos no BD FACSCanto™ II).
A) paciente com clone PNH; B) dador saudável



iRBCs (eritrócitos imaturos)

Visualize os singletos CD235a+ RBC num diagrama de pontos CD71 APC versus CD235a FITC e separe os iRBCs CD71+ (Figura 6).

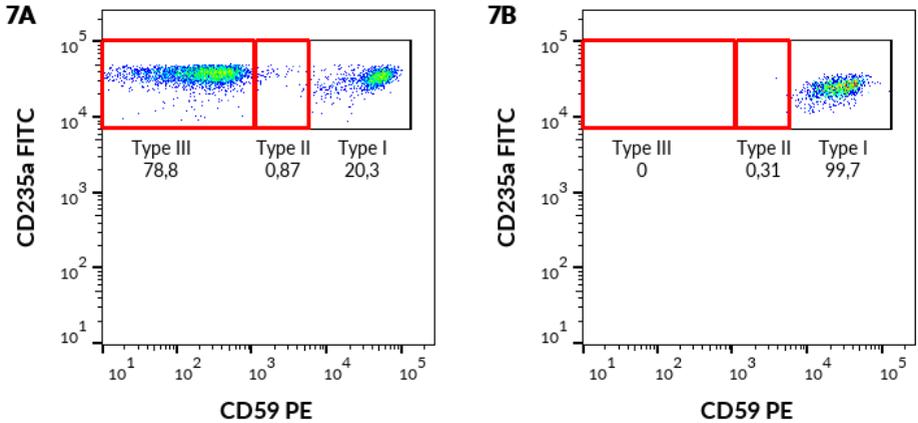
Figura 6 Singletos CD235a+ RBC num diagrama de pontos CD71 APC vs. CD235a FITC. Delineamento dos iRBCs CD71+ (dados adquiridos no BD FACSCanto™ II).



Visualize os iRBCs CD71+ num diagrama de pontos CD59 PE versus CD235a FITC. Separe os eventos em três populações usando três limites apropriados (Figura 7) e calcule a porcentagem de eventos nas regiões do Tipo I, Tipo II e Tipo III.

Figura 7 iRBCs CD71+ num diagrama de pontos CD59 PE vs. CD235a FITC (dados adquiridos no BD FACSCanto™ II).

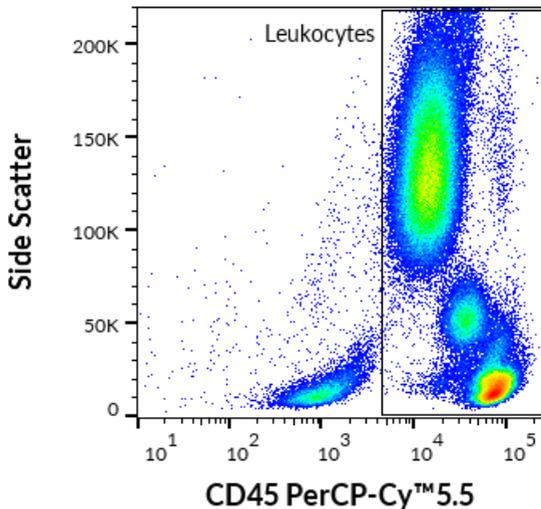
A) paciente com clone PNH; B) dador saudável



Tubo PNH WBC 7-color (faixa ciano)

Adquira pelo menos 200 000 eventos para análise. Visualize os dados compensados num diagrama de pontos de dispersão lateral versus intensidade de fluorescência em PerCP-Cy™ 5.5. Delimite os leucócitos CD45+ como indicado na Figura 8.

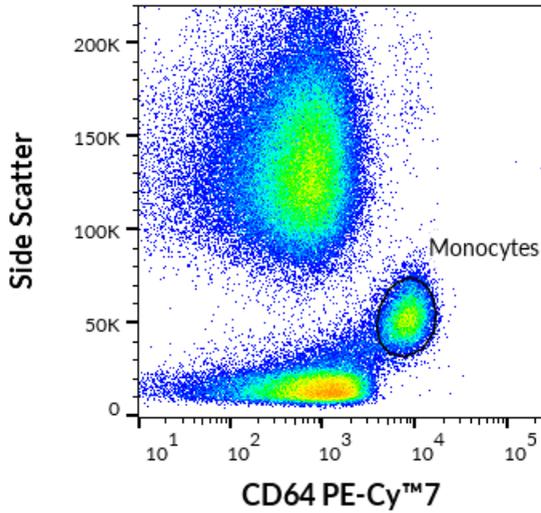
Figura 8 Delineamento de leucócitos CD45+ (dados adquiridos no BD FACSCanto™ II).



Monócitos

Visualize os leucócitos CD45+ num diagrama de pontos de dispersão lateral versus CD64 PE-Cy™7 e delimite os monócitos CD64+ conforme representado na Figura 9.

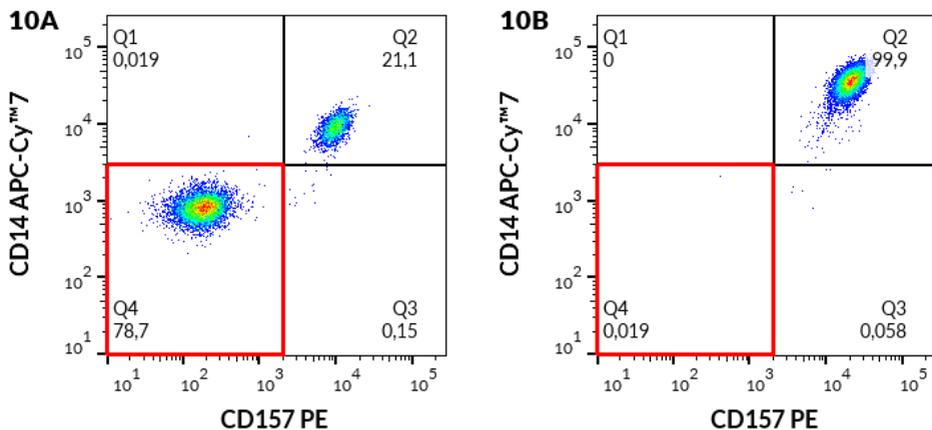
Figura 9 Delineamento de monócitos CD64+ a partir de leucócitos (dados adquiridos no BD FACSCanto™ II).



Visualize os monócitos CD64+ num diagrama de pontos CD157 PE versus CD14 APC-Cy™7 (Figura 10). Defina os limites aproximados e calcule a percentagem da população CD157-CD14- no quadrante Q4.

Figura 10 Monócitos CD64+ num diagrama de pontos CD157 PE vs. CD14 APC-Cy™7 (dados adquiridos no BD FACSCanto™ II).

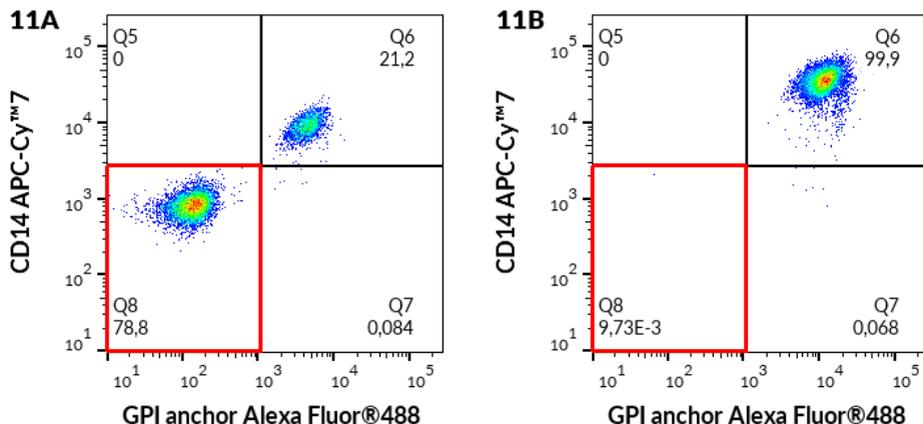
A) paciente com clone PNH; B) dador saudável



Depois, visualize os mesmos monócitos CD64+ num diagrama de pontos Proaerolisina Alexa Fluor® 488 (âncora de GPI) versus CD14 APC-Cy™7 (Figura 11). Defina os limites apropriados e calcule a percentagem da população da âncora GPI-CD14- no quadrante Q4.

Figura 11 Monócitos CD64+ num diagrama de pontos Proaerolisina Alexa Fluor® 488 (âncora de GPI) vs. CD14 APC Cy™7 (dados adquiridos no BD FACSCanto™ II).

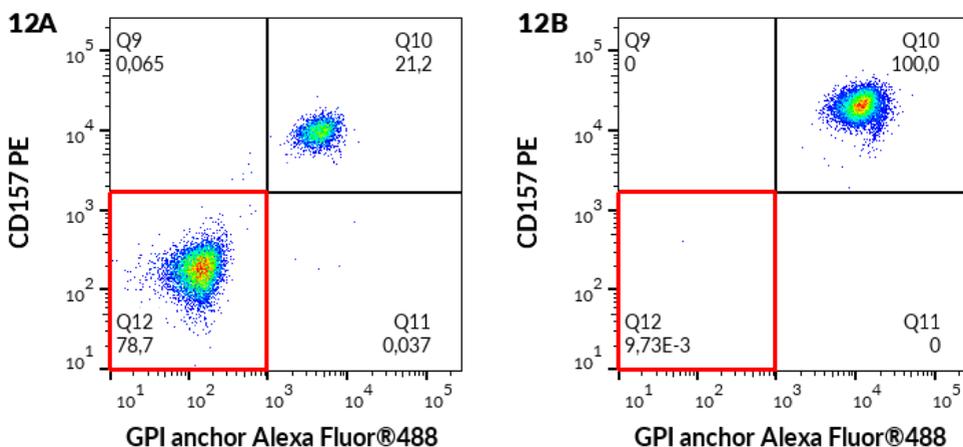
A) paciente com clone PNH; B) dador saudável



Depois, visualize os mesmos monócitos CD64+ num diagrama de pontos Proaerolisina Alexa Fluor® 488 (âncora de GPI) versus CD157 PE (Figura 12). Defina os limites apropriados e calcule a percentagem da população da âncora GPI-CD157- no quadrante Q4.

Figura 12 Monócitos CD64+ num diagrama de pontos Proaerolisina Alexa Fluor® 488 (âncora de GPI) vs. CD157 PE (dados adquiridos no BD FACSCanto™ II).

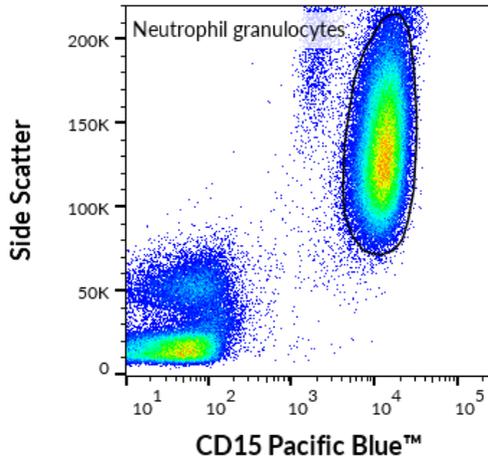
A) paciente com clone PNH; B) dador saudável.



Granulócitos neutrófilos

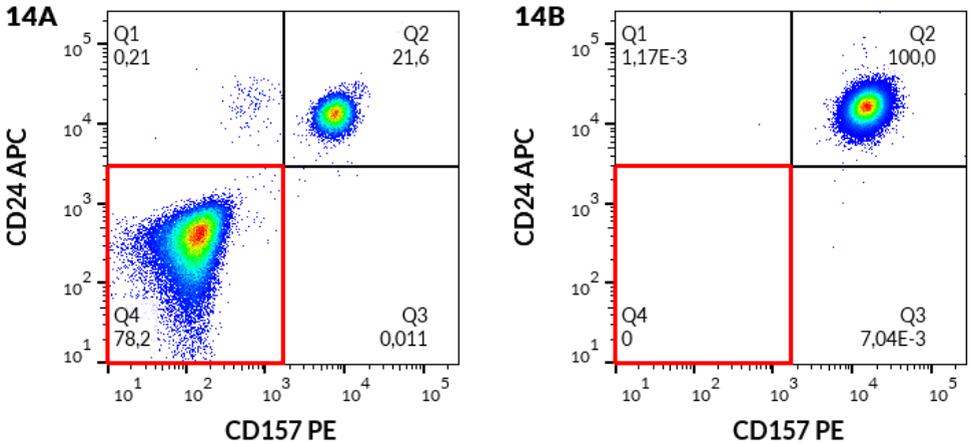
Visualize leucócitos CD45+ num diagrama de pontos de dispersão lateral versus CD15 Pacific Blue™ e separe os granulócitos neutrófilos CD15+ conforme representado na Figura 13.

Figura 13 Delineamento de granulócitos neutrófilos CD15+ a partir de leucócitos (dados adquiridos no BD FACSCanto™ II) (dados adquiridos no BD FACSCanto™ II).



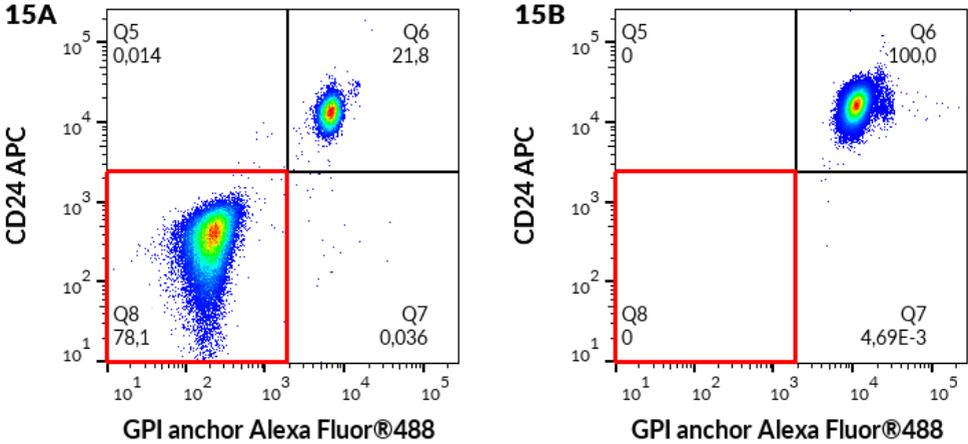
Visualize granulócitos neutrófilos CD15+ num diagrama de pontos CD157 PE versus CD24 APC conforme representado na Figura 14. Defina os limites apropriados e calcule a percentagem da população CD157- CD24- no quadrante Q4.

Figura 14 Granulócitos neutrófilos CD15+ num diagrama de pontos CD157 PE vs. CD24 APC (dados adquiridos no BD FACSCanto™ II).
A) paciente com clone PNH; B) dador saudável



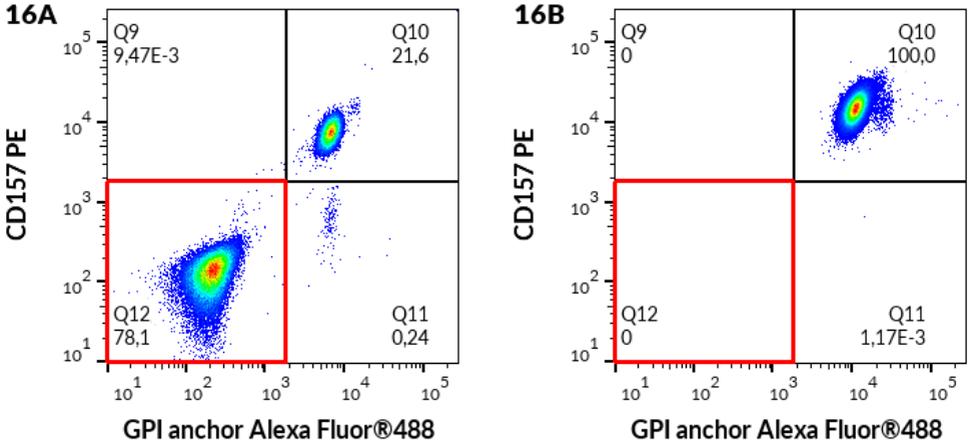
Depois, visualize os mesmos granulócitos neutrófilos CD15+ num diagrama de pontos Proaerolisina Alexa Fluor® 488 (âncora de GPI) versus CD24 APC, defina limites apropriados e calcule a percentagem da população da âncora GPI- CD24- no quadrante Q4 conforme representado na Figura 15.

Figura 15 Granulócitos neutrófilos CD15+ num diagrama de pontos Proaerolisina Alexa Fluor® 488 (âncora de GPI) vs. CD24 APC (dados adquiridos no BD FACSCanto™ II).
A) paciente com clone PNH; B) dador saudável



Depois, visualize os mesmos granulócitos neutrófilos CD15+ num diagrama de pontos Proaerolisina Alexa Fluor® 488 (âncora de GPI) versus CD157 PE, defina limites apropriados e calcule a percentagem da população da âncora de GPI-CD157- no quadrante Q4 conforme representado na Figura 16.

Figura 16 Granulócitos neutrófilos CD15+ num diagrama de pontos Proaerolisina Alexa Fluor® 488 (âncora de GPI) vs. CD157 PE (dados adquiridos no BD FACSCanto™ II).
A) paciente com clone PNH; B) dador saudável



Cálculo e interpretação de resultados analíticos

Enumere a percentagem de células com deficiência de GPI (tendo fenótipo PNH), consulte a Tabela 5.

Tabela 5 Fenótipos de clone PNH

População de células-mãe		Fenótipo PNH de acordo com a estratégia de limitação
Tubo PNH RBC 3-color	Eritrócitos (Tipo III)	CD59- CD235a+ (Fig. 5)
	Eritrócitos (Tipo II)	CD59 dim CD235a+ (Fig. 5)
	iRBCs (Tipo III)	CD59- CD235a+CD71+(Fig. 7)
	iRBCs (Tipo II)	CD59 dim CD235a+CD71+(Fig. 7)
Tubo PNH WBC 7-color	Monócitos	CD14- CD157- CD64+ (Fig. 10)
		CD14- âncora GPI- CD64+ (Fig. 11)
		CD157- âncora GPI - CD64+ (Fig. 12)
	Granulócitos neutrófilos	CD24- CD157- CD15+ (Fig. 14)
		CD24- âncora GPI - CD15+ (Fig. 15)
		CD157- âncora GPI- CD15+ (Fig. 16)

Tabela 6 Interpretação dos resultados

Limite de detecção (limiar) para os tubos WBC e RBC reportado como frequência do principal (%), calculado a partir de 100 medições de n=25 amostras normais de pacientes em n=4 diferentes plataformas de citômetro.				
Fenótipo PNH	Citômetro			
	BD FACS Lyric™	BD FACS Canto™ II	Beckman Coulter NAVIOS EX	Beckman Coulter DX Flex
Tubo PNH RBC 3-color				
CD59- Tipo II e RBC Tipo III	0.005	0.002	0.029	0.049
CD59- Tipo II e iRBCs Tipo III	0.240	0.320	0.388	0.562
Tubo PNH WBC 7-color				
Monócitos CD157- CD14-	0.20	0.19	0.14	0.30
Monócitos CD14- âncora GPI-	0.08	0.04	0.10	0.17
Monócitos CD157- âncora GPI-	0.07	0.06	0.04	0.03
CD157- CD24- Granulócitos neutrófilos	0.02	0.02	0.06	0.03
Granulócitos neutrófilos CD24- âncora GPI-	0.03	0.03	0.02	0.02
Granulócitos neutrófilos CD157- âncora GPI-	0.01	0.01	0.01	0.01

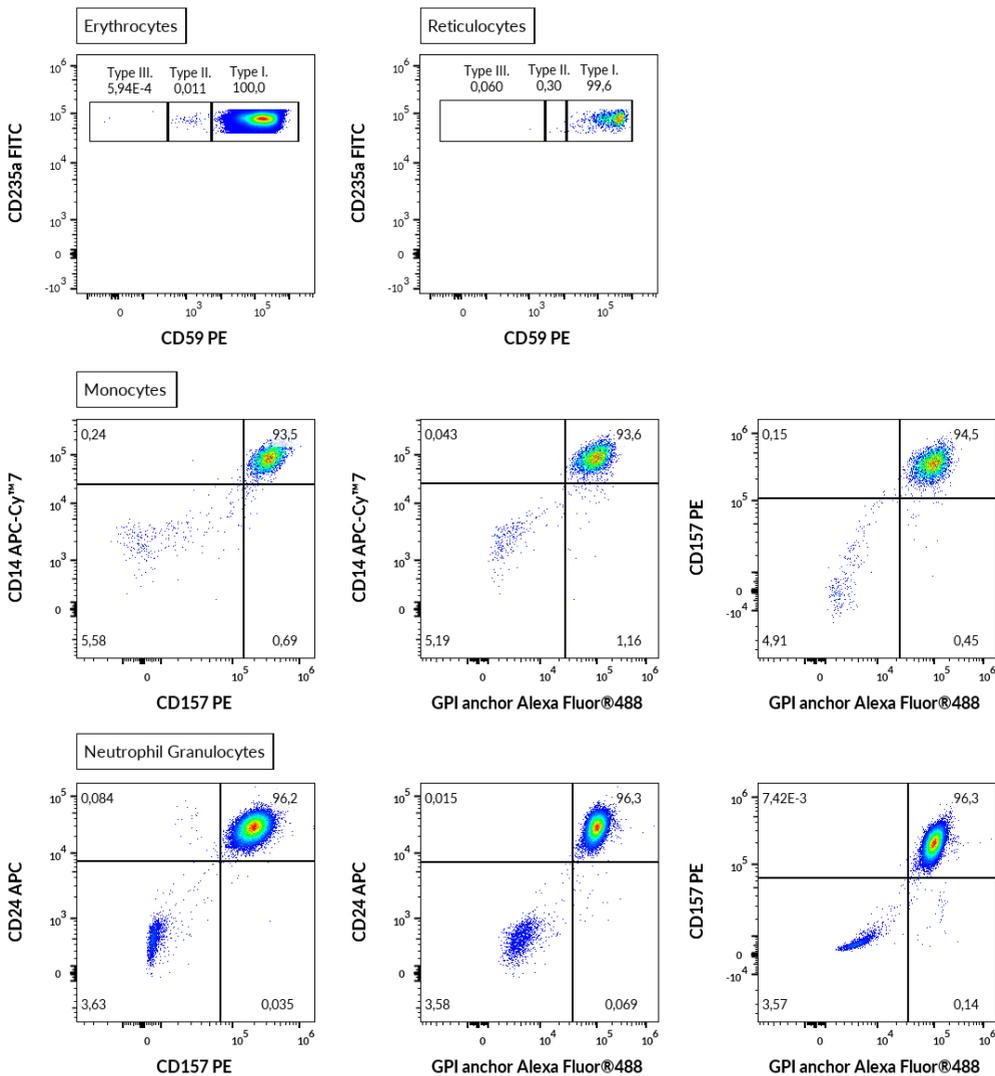
Regras do algoritmo de reporte de deficiência GPI

1. Em pacientes com frequência de população de células com deficiência GPI **inferior** ao valor do limiar (Tabela 6), os resultados devem ser reportados como: **“granulócitos, monócitos, RBC e iRBCs revelam expressão normal de antígenos associados ao GPI. Nenhum clone PNH detetado”** ⁽¹⁾.
2. Em pacientes com frequência de população de células com deficiência GPI **superior** ao valor do limiar (Tabela 6), os resultados devem ser reportados como: **“granulócitos, monócitos, RBC ou iRBCs revelam deficiência GPI parcial ou completa”. Clones PNH detetados.**

CUIDADO: O laboratório clínico tem de estabelecer o seu próprio limite de detecção (LOD)/Valores limiar a partir de um conjunto de amostras normais de pacientes ao usar um tipo e/ou marca diferente de citómetro do especificado nas Tabelas 8-11 (ver secção 11. Desempenho analítico/ Limite de detecção / Limiar de análise).

3. Na maioria dos casos de PNH, todas as populações-alvo de células WBC revelam a presença de clones PNH^(4, 6, 7, 8). Os clones WBC PNH aparecem agregados e menos dispersos do que os eventos negativos duplos aleatórios.
4. Em alguns casos, a presença de um clone PNH poderá ser detetada no tubo WBC, embora não seja detetada num tubo RBC, conforme demonstrado na **Fig. 17**. Neste caso, a presença de um clone PNH tem de ser reportada de acordo com a **regra 2 do algoritmo de reporte de deficiência GPI**.
5. Se algum clone PNH for detetado, reporte sempre a percentagem de todos os fenótipos de clones PNH (Tabela 6) a partir da sua população de células-mãe. Os monócitos podem revelar maior tamanho de clone PNH do que os granulócitos neutrófilos ⁽²⁾.
6. A deficiência de GPI (presença de clone de HPN) deve ser expressa em todos os fenótipos de HPN num determinado subconjunto de leucócitos. Espera-se que todos os fenótipos de HPN de monócitos (Quadro 5) corem as células deficientes em GPI de forma semelhante ⁽⁶⁾. O mesmo se aplica aos fenótipos de neutrófilos da HPN.

Figura 17 Exemplo de um caso com presença de um clone PNH num tubo WBC, embora não seja detetado num tubo RBC (dados adquiridos no Beckman Coulter DxFLEx).



11. Desempenho analítico

Especificidade

A Proaerolisina Alexa Fluor® 488 é uma variante com rótulo fluorescente da aerolisina bacteriana que se vincula especificamente a âncoras GPI de proteínas da membrana de superfície das células humanas ^(1, 2, 5, 8).

O anticorpo SY11B5 reconhece um epítipo extracelular no antigénio CD157 do antigénio CD157 expresso principalmente em monócitos e granulócitos. A especificidade do anticorpo foi confirmada pelo Conselho HCDM (workshop HLDA X).

O anticorpo 2D1 reconhece todas as isoformas de leucócitos do CD45 humano (Antigénio Comum de Leucócitos). A especificidade do anticorpo foi confirmada pelo Conselho HCDM (workshop HLDA III).

O anticorpo 10.1 reconhece o antigénio CD64 humano, que é expresso nos monócitos. A especificidade do anticorpo foi confirmada pelos workshops HLDA (HLDA III: Workshop WS Code M-250).

O anticorpo SN3 reage com o antigénio CD24, expresso pelos granulócitos. A especificidade do anticorpo foi confirmada pelo workshop HLDA (HLDA IV: WS Code B 136; HLDA V: WS Code B CD24.7)

O anticorpo MEM-15 reage com CD14, uma glicoproteína de membrana extracelular ligada ao GPI (glicofosfatidilinositol) expressa nos monócitos. A especificidade do anticorpo foi confirmada pelo Conselho HCDM (workshops HLDA III: WS Code M 252; HLDA IV: WS Code M 113; HLDA IV: WS Code NL 90; HLDA IV: WS Code T 53; HLDA V: WS Code M MA086; HLDA VI: WS Code M MA94).

O anticorpo MEM-158 reage com o CD15, com forte expressão na superfície dos granulócitos. A especificidade do anticorpo foi confirmada pelo Conselho HCDM (workshop HLDA VI: WS Code AS A053).

O anticorpo JC159 reconhece um epítipo da porção extracelular do CD235a (glicoforina A), uma sialoglicoproteína expressa nos eritoblastos precoces, eritoblastos posteriores, eritoblastos e eritrócitos maduros.

O anticorpo MEM-43 reage com o epítipo bem definido no CD59 (Protectin), glicoproteína ancorada no GPI e expressa na superfície de todas as células hematopoiéticas. A especificidade do anticorpo foi confirmada pelo workshop HLDA (HLDA IV: WS Code NL 705; HLDA V: WS Code AS S013; HLDA V: WS Code BP BP345; HLDA V: WS Code T T-103).

O anticorpo MEM-75 reage com um epítipo extracelular do antigénio CD71 expresso nos iRBCs imaturos. A especificidade do anticorpo foi confirmada pelo workshop HLDA (HLDA IV: WS Code A 45; HLDA V: WS Code T T-165).

Precisão

A precisão do método foi determinada como comparação do dispositivo DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kit com um método interno de um laboratório clínico acreditado através da coloração paralela de 13 pacientes com presença confirmada do fenótipo PNH. Os parâmetros de análise da regressão linear são fornecidos na Tabela 7.

Tabela 7 Análise de regressão linear para valores relativos de populações de células com deficiência GPI (fenótipos PNH) em pacientes com presença confirmada de fenótipos PNH (comparação do dispositivo A precisão do método foi determinada como comparação do dispositivo DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kit com um método interno de um laboratório clínico acreditado através da coloração paralela de 13 pacientes com presença confirmada do fenótipo PNH. com um método interno de um laboratório clínico acreditado (um cocktail de anticorpos conjugados de cor única de diferentes fabricantes e analisado com recurso a BD FACSCanto™ II))

Subconjunto de linfócitos	n	Inclinação	Interceção	R ²	Varição [%]
Eritrócitos Tipo III CD59-CD235a+	13	0.99	-0.026	1.00	1.28 - 83.79
iRBCs Tipo III CD59-CD235a+	13	0.99	-0,384	1.00	5.97 - 97.78
Eritrócitos Tipo II CD59-CD235a+	13	1.00	-0,059	1.00	0.13 - 89.92
iRBCs Tipo II CD59-CD235a+	13	0.98	0.141	1.00	0.33 - 74.67
Monócitos CD157- âncora GPI- CD64+	13	1.00	0.060	1.00	2.07 - 99.95
Neutrófilos CD157- âncora GPI- CD15+	13	0.99	0.294	1.00	0.80 - 99.82
Monócitos CD14- âncora GPI- CD64+	13	Não determinado			2.04 - 99.96
Monócitos CD14- CD157- CD64+	13	Não determinado			2.17 - 99.96
Neutrófilos CD24- CD157- CD15+	13	Não determinado			0.80 - 99.83
Neutrófilos CD24- âncora GPI- CD15+	13	Não determinado			0.81 - 99.80

n = número de amostras de sangue

Limite de detecção / Limite de quantificação / Assay Cut-off

O limite de detecção (LOD) foi determinado para cada população-alvo (ver Tabela 5) como valor médio dos resultados de 25 dadores de sangue saudáveis, aumentado por adição de três desvios-padrão da média para 4 diferentes plataformas de citómetro de fluxo e expresso como Limiar de análise nas Tabelas 8, 9, 10 e 11.

CUIDADO: O laboratório clínico tem de estabelecer o seu próprio limite de detecção (LOD)/Valores limiar a partir de um conjunto de amostras normais de pacientes ao usar um tipo e/ou marca diferente de citómetro do especificado nas Tabelas 8-11.

Tabela 8 Valores limiar do Kit DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay para cada fenótipo PNH juntamente com a incidência de fenótipos PNH e LOQ adquiridos no citómetro de fluxo BD FACSLytic™.

Fenótipo PNH	BD FACSLytic™					
	n	Média [%]	SD [%]	Incidência de fenótipo PNH	Limiar (Média + 3*SD)	LOQ (Média + 10*SD)
Tubo RBC (1 000 000 eventos adquiridos; mín. 80% de eventos RBC singletos)						
RBC Tipo II e Tipo III CD59-	25	0.003	0.001	5 – 48 eventos por 1 000 000 eventos (Média de 15 eventos)	0.005 %	0.012 %
iRBCs Tipo II e Tipo III CD59-	25	0.054	0.061	0 – 5 eventos por 3 000 iRBCs (Média de 2 eventos)	0.240 %	0.660 %
Tubo WBC (200 000 eventos adquiridos)						
Monócitos CD157-CD14-	25	0.076	0.041	2 – 24 eventos por 10 000 monócitos (Média de 8 eventos)	0.20 %	0.49 %
Monócitos CD14-âncora GPI-	25	0.021	0.018	0 – 5 eventos por 10 000 monócitos (Média de 2 eventos)	0.08 %	0.20 %
Monócitos CD157-âncora GPI-	25	0.014	0.020	0 – 4 eventos por 10 000 monócitos (Média de 1 eventos)	0.07 %	0.21 %
CD157- CD24-Granulócitos neutrófilos	25	0.006	0.006	0 – 20 eventos por 100 000 neutrófilos (Média de 5 eventos)	0.02 %	0.07 %
Granulócitos neutrófilos CD24-	25	0.006	0.008	0 – 29 eventos por 100 000 neutrófilos	0.03 %	0.09 %

âncora GPI-				(Média de 6 eventos)		
Granulócitos neutrófilos CD157-âncora GPI-	25	0.002	0.002	0 - 8 eventos por 100 000 neutrófilos (Média de 2 eventos)	0.01 %	0.02 %

Tabela 9 Valores limiar do Kit DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay para cada fenótipo PNH juntamente com a incidência de fenótipos PNH e LOQ adquiridos no citômetro de fluxo BD FACSCanto™ II.

Fenótipo PNH	BD FACSCanto™ II					
	n	Média [%]	SD [%]	Incidência de fenótipo PNH	Limiar (Média + 3*SD)	LOQ (Média + 10*SD)
Tubo RBC (1 000 000 eventos adquiridos; mín. 80% de eventos RBC singletos)						
CD59- Tipo II e RBC Tipo III	25	0.0006	0,0004	1 - 12 eventos por 1 000 000 eventos (Média de 6 eventos)	0.002 %	0.004 %
CD59- Tipo II e iRBCs Tipo III	25	0.0657	0.0847	0 - 5 eventos por 1 000 iRBCs (Média de 1 eventos)	0.320 %	0.913 %
Tubo WBC (200 000 eventos adquiridos)						
Monócitos CD157-CD14-	25	0.085	0.035	2 - 16 eventos por 10 000 monócitos (Média de 8 eventos)	0.19 %	0.43 %
Monócitos CD14-âncora GPI-	25	0.086	0.096	0 - 3 eventos por 10 000 monócitos (Média de 1 eventos)	0.04 %	0.10 %
Monócitos CD157-âncora GPI-	25	0.084	0.019	0 - 7 eventos por 10 000 monócitos (Média de 1 eventos)	0.06 %	0.20 %
CD157- CD24-Granulócitos neutrófilos	25	0.004	0.052	0 - 17 eventos por 100 000 neutrófilos (Média de 5 eventos)	0.02 %	0.06 %
Granulócitos neutrófilos CD24-âncora GPI-	25	0.006	0.010	0 - 32 eventos por 100 000 neutrófilos (Média de 6 eventos)	0.03 %	0.10 %
Granulócitos neutrófilos CD157-	25	0.002	0.002	0 - 8 eventos por 100 000 neutrófilos	0.01 %	0.02 %

âncora GPI-				(Média de 2 eventos)		
-------------	--	--	--	----------------------	--	--

Tabela 10 Valores limiar do Kit DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kit para cada fenótipo PNH juntamente com a incidência de fenótipos PNH e LOQ adquiridos no citômetro de fluxo Beckman Coulter Navios EX.

Fenótipo PNH	Beckman Coulter Navios EX					
	n	Média [%]	SD [%]	Incidência de fenótipo PNH	Limiar (Média + 3*SD)	LOQ (Média + 10*SD)
Tubo RBC (1 000 000 eventos adquiridos; mín. 80% de eventos RBC singletos)						
CD59- Tipo II e RBC Tipo III	25	0.007	0.007	4 – 236 eventos por 1 000 000 eventos (Média de 60 eventos)	0.029 %	0.081 %
CD59- Tipo II e iRBCs Tipo III	25	0.087	0.100	0 – 6 eventos por 1 000 iRBCs (Média de 1 eventos)	0.388 %	1.092 %
Tubo WBC (200 000 eventos adquiridos)						
Monócitos CD157-CD14-	25	0.062	0.027	0 – 23 eventos por 10 000 monócitos (Média de 6 eventos)	0.14 %	0.33 %
Monócitos CD14-âncora GPI-	25	0.024	0.006	0 – 10 eventos por 10 000 monócitos (Média de 2 eventos)	0.10 %	0.28 %
Monócitos CD157-âncora GPI-	25	0.007	0.011	0 – 6 eventos por 10 000 monócitos (Média de 1 eventos)	0.04 %	0.12 %
CD157- CD24-Granulócitos neutrófilos	25	0.012	0.015	0 – 43 eventos por 100 000 neutrófilos (Média de 12 eventos)	0.06 %	0.16 %
Granulócitos neutrófilos CD24-âncora GPI-	25	0.005	0.005	0 – 13 eventos por 100 000 neutrófilos (Média de 5 eventos)	0.02 %	0.05 %
Granulócitos neutrófilos CD157-âncora GPI-	25	0.002	0.002	0 – 10 eventos por 100 000 neutrófilos (Média de 2 eventos)	0.01 %	0.03 %

Tabela 11 Valores limiar do Kit DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kit para cada fenótipo PNH juntamente com a incidência de fenótipos PNH e LOQ adquiridos no citômetro de fluxo Beckman Coulter DxFLEx.

Fenótipo PNH	Beckman Coulter DxFLEx					
	n	Média [%]	SD [%]	Incidência de fenótipo PNH	Limiar (Média + 3*SD)	LOQ (Média + 10*SD)
Tubo RBC (1 000 000 eventos adquiridos; mín. 80% de eventos RBC singletos)						
CD59- Tipo II e RBC Tipo III	25	0,015	0.012	5 – 48 eventos por 1 000 000 eventos (Média de 25 eventos)	0.049 %	0.129 %
CD59- Tipo II e iRBCs Tipo III	25	0.106	0.152	0 – 5 eventos por 1 000 iRBCs (Média de 2 eventos)	0.562 %	1.626 %
Tubo WBC (200 000 eventos adquiridos)						
Monócitos CD157-CD14-	25	0.092	0.068	0 – 27 eventos por 10 000 monócitos (Média de 10 eventos)	0.30 %	0.77 %
Monócitos CD14-âncora GPI-	25	0.053	0.040	0 – 16 eventos por 10 000 monócitos (Média de 6 eventos)	0.17 %	0.46 %
Monócitos CD157-âncora GPI-	25	0.005	0.009	0 – 1 eventos por 10 000 monócitos (Média de 1 eventos)	0.03 %	0.10 %
CD157- CD24-Granulócitos neutrófilos	25	0.010	0.008	0 – 28 eventos por 100 000 neutrófilos (Média de 10 eventos)	0.03 %	0.09 %
Granulócitos neutrófilos CD24-âncora GPI-	25	0.008	0.006	0 – 20 eventos por 100 000 neutrófilos (Média de 8 eventos)	0.02 %	0.06 %
Granulócitos neutrófilos CD157-âncora GPI-	25	0.002	0.002	0 – 5 eventos por 100 000 neutrófilos (Média de 2 eventos)	0.01 %	0.02 %

AVISO: Para análise de citometria de fluxo foram utilizados os seguintes citômetros de fluxo, incluindo a versão do software:

BD FACSCanto™ II BD FACSDiva Software – versão 8.0.2
 BD FACSLytic™ BD FACSuite™ Software – versão v1.5.0.925
 Beckman Coulter DxFLEx CytExpert for DxFLEx – versão 2.0.2.18
 Beckman Coulter Navios EX Navios EX Software – versão 2.2

Para avaliação dos dados medidos foi utilizada a seguinte plataforma de análise: FlowJo™ (Becton, Dickinson and Company) - versão 10.9.0

12. Desempenho clínico

Pacientes com deficiência GPI

Foram recolhidos dados clínicos de um estabelecimento clínico de 19 pacientes, tanto saudáveis ⁽⁶⁾ como com deficiência GPI confirmada ⁽¹³⁾. O desempenho clínico foi determinado por comparação do dispositivo DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kit com um método interno de um laboratório clínico acreditado (um cocktail de anticorpos conjugados de cor única de diferentes fabricantes e analisado com recurso a BD FACSCanto™ II).

A deficiência GPI nos pacientes foi avaliada em relação ao método usado (Tabela 12) por deteção de células com deficiência GPI (clones PNH).

Tabela 12 Desempenho clínico do dispositivo DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kit

		Avaliação da deficiência GPI usando um método interno de um laboratório clínico acreditado	
		Deficiência GPI	Condição normal
Avaliação da deficiência GPI usando o dispositivo DryFlowEx PNH High-Sensitivity Assay Kit	Deficiência GPI	13 pacientes	0 pacientes
	Condição normal	0 pacientes	6 pacientes

13. Valores esperados

Intervalo de Referência

Na população normal não é detetada qualquer deficiência de GPI e espera-se que todos os valores percentuais do fenótipo da HPN sejam inferiores ao valor de Assay Cut-off (LOD) ⁽⁶⁾.

14. Limites

Não foram identificadas limitações à utilização em tipos específicos de doenças, como as anemias.

A comunicação de deficiências de GPI é limitada, de acordo com as atuais diretrizes publicadas ⁽⁶⁾.

15. Referências

- 1) Borowitz, MJ et al. Guidelines for the diagnosis and monitoring of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and related disorders by flow cytometry. *Cytometry B Clin Cytom.* 2010 Jul;78(4):211-30. doi: 10.1002/cyto.b.20525.
- 2) Sutherland DR, Keeney M, Illingworth A. Practical guidelines for the high-sensitivity detection and monitoring of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria clones by flow cytometry. *Cytometry Part B* 2012; 82B: 195–208.
- 3) Marinov I, Illingworth AJ, Benko M, Sutherland DR. Performance Characteristics of a Non-Fluorescent Aerolysin-Based Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria (PNH) Assay for Simultaneous Evaluation of PNH Neutrophils and PNH Monocytes by Flow Cytometry, Following Published PNH Guidelines. *Cytometry B Clin Cytom.* 2018 Mar;94(2):257-263. doi: 10.1002/cyto.b.21389. Epub 2016 Jul 6. PMID: 27294344.
- 4) Dezern, AE and Borowitz, MJ. ICCS/ESCCA consensus guidelines to detect GPI-deficient cells in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) and related disorders part 1 – clinical utility. *Cytometry Part B* 2018; 94B: 16– 22.
- 5) Sutherland, DR, Illingworth, A, Marinov, I, Ortiz, F, Andreasen, J, Payne, D, Wallace, PK and Keeney, M. ICCS/ESCCA consensus guidelines to detect GPI-deficient cells in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) and related disorders part 2 – reagent selection and assay optimization for high-sensitivity testing. *Cytometry Part B* 2018; 94B: 23–48.
- 6) Illingworth, A, Marinov, I, Sutherland, DR, Wagner-Ballon, O and DelVecchio, L. ICCS/ESCCA Consensus Guidelines to detect GPI-deficient cells in Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria (PNH) and related Disorders Part 3 – Data Analysis, Reporting and Case Studies. *Cytometry Part B* 2018; 94B: 49–66.
- 7) Sutherland DR, Richards SJ, Ortiz F, Nayyar R, Benko M, Marinov I, Illingworth

- A. CD71 improves delineation of PNH type III, PNH type II, and normal immature RBCs in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Cytometry B Clin Cytom.* 2020 Mar;98(2):179-192. doi: 10.1002/cyto.b.21853. Epub 2019 Nov 8. PMID: 31705743.
- 8) Sutherland DR, Ortiz F, Quest G, Illingworth A, Benko M, Nayyar R, Marinov I. High-sensitivity 5-, 6-, and 7-color PNH WBC assays for both Canto II and Navios platforms. *Cytometry B Clin Cytom.* 2018 Jul;94(4):637-651. doi: 10.1002/cyto.b.21626. Epub 2018 Mar 5. PMID: 29381839
 - 9) Tate J, Ward G. Interferences in immunoassay. *Clin Biochem Rev.* 2004 May;25(2):105-20. PMID: 18458713; PMCID: PMC1904417.
 - 10) Selby C. Interference in immunoassay. *Ann Clin Biochem.* 1999 Nov; 36 (Pt 6):704-21. doi: 10.1177/000456329903600603. PMID: 10586307.
 - 11) Kricka LJ. Human anti-animal antibody interferences in immunological assays. *Clin Chem.* 1999 Jul;45(7):942-56. Erratum in: *Clin Chem* 2000 Oct;46(10):1722. PMID: 10388468.
 - 12) Higgins J, Hill V, Lau K, Simpson V, Roayaei J, Klabansky R, Stevens RA, Metcalf JA, Baseler M. Evaluation of a single-platform technology for lymphocyte immunophenotyping. *Clin Vaccine Immunol.* 2007 Oct;14(10):1342-8. doi: 10.1128/CVI.00168-07. Epub 2007 Aug 29. PMID: 17761524; PMCID: PMC2168127.
 - 13) Htun NM, Chen YC, Lim B, et al. Near-infrared autofluorescence induced by intraplaque hemorrhage and heme degradation as marker for high-risk atherosclerotic plaques. *Nat Commun.* 2017;8(1):75. Published 2017 Jul 13. doi:10.1038/s41467-017-00138-x
 - 14) de Jonge G, Dos Santos TL, Cruz BR, Simionatto M, Bittencourt JIM, Krum EA, Moss MF, Borato DCK. Interference of in vitro hemolysis complete blood count. *J Clin Lab Anal.* 2018 Jun;32(5):e22396. doi: 10.1002/jcla.22396. Epub 2018 Feb 3. PMID: 29396875; PMCID: PMC6817011.
 - 15) Haga Y, Kay HD, Tempero MA, Zetterman RK. Flow cytometric measurement of intracellular bilirubin in human peripheral blood mononuclear cells exposed to unconjugated bilirubin. *Clin Biochem.* 1992 Aug;25(4):277-83. doi: 10.1016/0009-9120(92)80033-d. PMID: 1381998.
 - 16) Lam WK, Law YFW, Yip SF. Resolution of platelet count interference due to cytoplasmic fragments of leukaemic cells by flow cytometry in acute myeloid leukaemia. *Int J Lab Hematol.* 2022 Dec;44(6):983-985. doi: 10.1111/ijlh.13859. Epub 2022 May 3. PMID: 35504732.
 - 17) Hervé Lecoeur, Marie-Lise Gougeon, Comparative analysis of flow cytometric methods for apoptosis quantitation in murine thymocytes and human peripheral lymphocytes from controls and HIV-infected persons Evidence for

- interference by granulocytes and erythrocytes, *Journal of Immunological Methods*, Volume 198, Issue 1, 1996, Pages 87-99, ISSN 0022-1759, [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(96\)00148-2](https://doi.org/10.1016/0022-1759(96)00148-2).
- 18) Bartels EM, Falbe Wätjen I, Littrup Andersen E, Danneskiold-Samsøe B, Bliddal H, Ribel-Madsen S. Rheumatoid factor and its interference with cytokine measurements: problems and solutions. *Arthritis*. 2011;2011:741071. doi: 10.1155/2011/741071. Epub 2011 Jun 22. PMID: 22046523; PMCID: PMC3200114.
 - 19) XUE Yan, XU Li, DANG Liheng, WANG Chao, CUI Yaqiong, WANG Ping, WANG Ning, ZHANG Xinjie, LIU Yang. Interference of high levels of bilirubin on lymphocyte subset determination in peripheral blood by flow cytometry and its elimination methods[J]. *Laboratory Medicine*, 2022, 37(12): 1169-1173
 - 20) van Ierssel SH, Hoymans VY, Van Craenenbroeck EM, Van Tendeloo VF, Vrints CJ, et al. (2012) Endothelial Microparticles (EMP) for the Assessment of Endothelial Function: An In Vitro and In Vivo Study on Possible Interference of Plasma Lipids. *PLOS ONE* 7(2): e31496. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031496>
 - 21) Yasmine Van Caeneghem, Stijn De Munter, Paola Tieppo, Glenn Goetgeluk, Karin Weening, Greet Verstichel, Sarah Bonte, Tom Taghon, Georges Leclercq, Tessa Kerre, Reno Debets, David Vermijlen, Hinrich Abken & Bart Vandekerckhove (2017) Antigen receptor-redirected T cells derived from hematopoietic precursor cells lack expression of the endogenous TCR/CD3 receptor and exhibit specific antitumor capacities, *Oncolmunology*, 6:3, DOI: 10.1080/2162402X.2017.1283460
 - 22) Lamia Achour, Mark G. H. Scott, Hamasseh Shirvani, Alain Thuret, Georges Bismuth, Catherine Labbé-Jullié, Stefano Marullo; CD4-CCR5 interaction in intracellular compartments contributes to receptor expression at the cell surface. *Blood* 2009; 113 (9): 1938–1947. doi: <https://doi.org/10.1182/blood-2008-02-141275>
 - 23) A. Stronkhorst, G. N. J. Tytgat & S. J. H. Van Deventer (1992) CD4 Antibody Treatment in Crohn's Disease, *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 27:sup194, 61-65, DOI: 10.3109/00365529209096029
 - 24) Zinzani, P.L., Minotti, G. Anti-CD19 monoclonal antibodies for the treatment of relapsed or refractory B-cell malignancies: a narrative review with focus on diffuse large B-cell lymphoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 148, 177–190 (2022). <https://doi.org/10.1007/s00432-021-03833-x>
 - 25) Whiteman KR, Johnson HA, Mayo MF, Audette CA, Carrigan CN, LaBelle A, Zukerberg L, Lambert JM, Lutz RJ. Lorvotuzumab mertansine, a CD56-targeting antibody-drug conjugate with potent antitumor activity against small

cell lung cancer in human xenograft models. MAbs. 2014 Mar-Apr;6(2):556-66. doi: 10.4161/mabs.27756. Epub 2014 Jan 8. PMID: 24492307; PMCID: PMC3984343.

- 26) J Frengen, B Kierulf, R Schmid, T Lindmo, K Nustad, Demonstration and minimization of serum interference in flow cytometric two-site immunoassays, *Clinical Chemistry*, Volume 40, Issue 3, 1 March 1994, Pages 420–425, <https://doi.org/10.1093/clinchem/40.3.420>
- 27) Urbina, A. and Palomino, F. (2013), Reticulocyte count in red-blood-cell units stored in AS-1. *Vox Sang*, 104: 331-336. <https://doi.org/10.1111/vox.12011>
- 28) Ware RE, Rosse WF, Hall SE; Immunophenotypic analysis of reticulocytes in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 1995; 86 (4): 1586–1589. doi: <https://doi.org/10.1182/blood.V86.4.1586.bloodjournal8641586>

16. Resumo da segurança e do desempenho

O resumo da segurança e do desempenho estará disponível na base de dados Eudamed em <https://ec.europa.eu/tools/eudamed/#/screen/home>. Até lá, o resumo da segurança e do desempenho está disponível mediante pedido.

17. Utilização de Marcas Registradas de Terceiros

BD FACSCanto™ II, BD FACSLyric™ e FlowJo™ são marcas registradas da Becton, Dickinson and Company, Cy™ e CyDye™ é uma marca registrada Cytiva. VenturiOne® é uma marca registrada da Applied Cytometry, Infinicyt™ é uma marca registrada da Cytognos S.L.. SPHERO™ COMPtrol é uma marca registrada da Spherotech, Inc.

18. Histórico de revisões

Versão 2, ED7750_IFU_v2

- 1) Interferência endógena e exógena adicionada.
- 2) A secção "Regras do algoritmo de comunicação de deficiências de GPI" foi atualizada.
- 3) Secção 13. Valores esperados – pequenas correções de texto.
- 4) Referências atualizadas.
- 5) Adição do número de Identificação do Organismo Notificado.
- 6) Adição do novo capítulo número 16. Resumo da segurança e do desempenho.

19.Fabricante

EXBIO Praha, a.s.
Nad Safinou II 341
25250 Vestec
Czech Republic

Informação de contacto

info@exbio.cz
technical@exbio.cz
orders@exbio.cz
www.exbio.cz

20.Representantes autorizados

N/A

AVISO: Qualquer incidente grave que tenha ocorrido em relação ao dispositivo deve ser comunicado ao fabricante e à autoridade local competente.